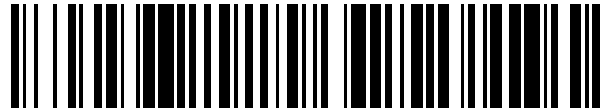


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 654**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2003 E 03789540 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1569688**

54 Título: **Una vacuna que comprende un antígeno conjugado con anticuerpos anti-CD40 de valencia baja**

30 Prioridad:

11.12.2002 GB 0228796

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.08.2013

73 Titular/es:

**ADJUVANTIX LIMITED (100.0%)
FIRTH COURT WESTERN BANK
SHEFFIELD S10 2TN, GB**

72 Inventor/es:

**HEATH, ANDREW y
LAING, PETER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 420 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Una vacuna que comprende un antígeno conjugado con anticuerpos anti-CD40 de valencia baja

La invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo y un antígeno, en el que dicho conjugado tiene una baja valencia de anticuerpo, y incluye métodos para preparar dicho conjugado.

5 El sistema inmunológico está formado por linfocitos que son capaces de reconocer antígenos específicos. Los linfocitos B reconocen antígenos en su conformación nativa a través de receptores de inmunoglobulina de la superficie, y los linfocitos T reconocen los antígenos de las proteínas que se presentan como péptidos junto con moléculas del propio organismo conocidas como antígenos de histocompatibilidad mayor (MHC), o antígenos de leucocitos humanos (HLA) en los seres humanos, presentes sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos aparecen en diferentes formas y pueden distinguirse en células presentadoras de antígenos "clásicas", ejemplificadas por macrófagos y células dendríticas, y células presentadoras de antígeno "no clásicas", que incluyen linfocitos B. Los linfocitos T pueden también subdividirse en "linfocitos T citotóxicos", que son capaces de matar a las células diana infectadas por virus, y linfocitos "T auxiliares". Los linfocitos T auxiliares tienen una función reguladora y son capaces de ayudar a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos específicos, o ayudan a los macrófagos a matar patógenos intracelulares.

10 Los anticuerpos pueden existir en varias formas, por ejemplo, existen las clases principales IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, cada una de las cuales se diferencia en las funciones "efectoras", con las que se determina el efecto del anticuerpo. Las funciones efectoras incluyen la fijación del complemento (que produce la estimulación de respuestas inflamatorias) que puede activarse tras la formación de complejos inmunológicos de antígeno y anticuerpo por IgM, IgA e IgG. Otro ejemplo de una función efectora es la activación de células cebadas por un antígeno, que se realiza mediante reticulación de IgE de la superficie con las células cebadas, anclado mediante la ocupación del receptor de alta afinidad FcR-épsilon-I de IgE (un receptor para la región Fc de IgE). Para algunas de las clases de anticuerpos existen subclases (por ejemplo, IgG en el ser humano está compuesto por cuatro subclases diferentes, conocidas como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Las subclases de IgG se diferencian notablemente en su abundancia y sus funciones efectoras.

15 Uno de los avances más importantes en la historia de la medicina es la aparición de las vacunas, que se emplean para proteger frente a una amplia variedad de enfermedades infecciosas. También existen vacunas en desarrollo para el tratamiento de diversas enfermedades no infecciosas, tales como enfermedades autoinmunitarias y neurodegenerativas y diversos cánceres. Muchas vacunas se preparan con patógenos inactivados o atenuados que se inyectan en un individuo. El individuo inmunizado responde produciendo una respuesta humoral (anticuerpo) y celular (células T citolíticas, CTL). Por ejemplo, algunas vacunas de la gripe se preparan inactivando el virus mediante un tratamiento químico con formaldehído; de forma parecida, la vacuna de la polio de Salk comprende virus completos inactivados con propionolactona. Para muchos patógenos (en particular, bacterias), una inactivación química o con calor, aunque puede producir inmunógenos de vacuna que confieren inmunidad protectora, también provocan efectos secundarios, tales como fiebre y reacciones en el sitio de la inyección. En el caso de las bacterias, los organismos inactivados tienden a ser tan tóxicos que los efectos secundarios han limitado la aplicación de estos inmunógenos de vacuna brutos (por ejemplo, la vacuna de pertussis celular). Por tanto, muchas vacunas modernas se preparan a partir de antígenos protectores del patógeno, separados mediante purificación o clonación molecular a partir de materiales que producen efectos secundarios. Estas últimas vacunas se conocen como "vacunas de subunidades".

20 El desarrollo de vacunas de subunidades (por ejemplo, vacunas en las que el inmunógeno es una proteína purificada) ha sido el centro de investigaciones importantes en los últimos años. La aparición de nuevos patógenos (tales como VIH y estreptococos del grupo B) y el crecimiento de la resistencia a antibióticos han creado la necesidad de desarrollar nuevas vacunas y de identificar más moléculas candidatas útiles para el desarrollo de vacunas de subunidades. De forma similar, el descubrimiento de nuevos antígenos de vacunas a partir de estudios genómicos y proteómicos está permitiendo el desarrollo de nuevos candidatos a vacunas de subunidades, en particular contra patógenos bacterianos y cánceres. Sin embargo, aunque las vacunas de subunidades tienden a evitar los efectos secundarios de las vacunas de patógenos muertos o atenuados, su estado "puro" las ha separado de las "señales de peligro" que a menudo están asociadas a las vacunas de organismos completos, y las vacunas de subunidades no siempre tienen la inmunogenicidad adecuada. Muchos candidatos a vacunas de subunidades han fallado en ensayos clínicos en los últimos años, que en otra circunstancia podrían haber tenido éxito si hubiera estado disponible un adyuvante adecuado que potenciase la respuesta inmunológica frente al antígeno purificado. Un adyuvante es una sustancia o un procedimiento que potencia las respuestas inmunológicas específicas frente a antígenos modulando la actividad de las células inmunológicas.

25 Los inventores describen un adyuvante con mayor eficacia. Un adyuvante es una sustancia o un procedimiento que potencia las respuestas inmunológicas específicas frente a antígenos modulando la actividad de las células inmunológicas. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, solo como ejemplo, adyuvante de Freund, dipéptidos de muramilo, y liposomas. Los documentos WO97/38711, US02/0136722 y US 02/0086026 describen, entre otras cosas, conjugados de CD28:antígeno y CD40:antígeno, que actúan como adyuvantes y producen respuestas inmunológicas potenciadas dirigidas a la parte del antígeno del conjugado.

Los conjugados de CD28/CD40:antígeno pueden producirse mediante una serie de formas, y utilizan una serie de posibles agentes de reticulación. En los catálogos de Pierce Chemical Company Inc. y Molecular Probes Inc se describe una serie de agentes de reticulación y métodos de reticulación. Los métodos de conjugación preferidos emplean los denominados agentes de reticulación heterobifuncionales, que tienen cada uno diferentes grupos funcionales en cada extremo de la molécula, y así su uso puede evitar una reticulación directa entre antígeno-antígeno, o una reticulación entre anticuerpo-anticuerpo. Sin embargo, a pesar de las ventajas de estos agentes de reticulación, en muchos casos siguen pudiéndose formar conjugados que contienen más de una molécula de anticuerpo, y más de una molécula de antígeno.

Por ejemplo, si se emplean sulfo-SMCC y SATA como agentes de reticulación, uno de los componentes del conjugado primero se maleimida utilizando sulfo-SMCC, y el otro tiene grupos sulfhidrilo unidos utilizando SATA. Tanto la maleimidación como la modificación de sulfhidrilo se producen sobre aminas primarias, de las cuales puede haber varias sobre el anticuerpo y el antígeno (restos amino-terminales (4 en cada molécula de Ig), y cualquier resto lisina). Por tanto, es posible que cualquier antígeno se una a más de una molécula de anticuerpo, y que cualquier molécula de anticuerpo se una a más de una molécula de antígeno. De esta manera pueden formarse grandes complejos de anticuerpo y antígeno unidos covalentemente. Los complejos formados durante la conjugación pueden caracterizarse utilizando una serie de parámetros diferentes:

- i) tamaño global del conjugado (peso molecular);
- ii) proporción de anticuerpo a antígeno (peso:peso);
- iii) proporción de anticuerpo a antígeno (mol:mol);
- iv) número medio de moléculas de anticuerpo en el conjugado; y
- v) número medio de moléculas de antígeno en el conjugado.

Para cualquier antígeno de peso molecular conocido, todos estos parámetros pueden derivarse de (iv) y (v). Sin embargo, puesto que los antígenos varían en tamaño, las relaciones entre estos valores variarán, y así las formas óptimas de conjugados variarán entre antígenos pequeños (péptidos), intermedios (proteínas) y grandes (polisacáridos).

A partir de experimentos *in vitro* se sabe que la señalización a través de CD40 y CD28 se potencia aumentando la valencia de la interacción. Así, para lograr una proliferación óptima de células B o T, se adhieren anti-CD40 o anti-CD28 al plástico de placas de cultivo de tejidos antes de la adición de las células, o se reticulan mediante el uso de anticuerpos anti-Fc adheridos al plástico, o incluso a través del uso de líneas celulares que expresan el receptor de Fc, tales como células L929 que expresan CD32 que se adhieren al plástico de la placa de cultivo de tejidos (Banchereau *et al.*, Science, 1991, 252:70-72). De forma sorprendente, los inventores han descubierto que, a diferencia de la inducción de la proliferación *in vitro*, los efectos adyuvantes de los anticuerpos no se ven potenciados por el aumento en la multivalencia. En efecto, los efectos adyuvantes disminuyen cuando cualquiera de los anticuerpos está en un estado multivalente.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un adyuvante que comprende un conjugado aislado de un anticuerpo CD40 y al menos un antígeno tumoral, en el que dicho conjugado consiste en un complejo oligomérico en el que la valencia del anticuerpo del complejo consiste en una a dos moléculas de anticuerpo por complejo.

La formación de un "conjugado" se realiza mediante cualquier medio que produzca una reticulación de conjugación o asociación del antígeno con el anticuerpo.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un conjugado según la invención.

En una realización preferida de la invención, dicha composición comprende además un vehículo.

En otra realización preferida de la invención, dicha composición comprende además un segundo adyuvante.

El término "vehículo" se interpreta de la siguiente manera. Un vehículo es una molécula inmunogénica que, cuando se une a una segunda molécula, potencia las respuestas inmunológicas frente a esta última. Algunos antígenos no son intrínsecamente inmunogénicos (es decir, no son inmunogénicos por derecho propio), pero son capaces de generar respuestas de anticuerpos cuando se asocian con una molécula de proteína extraña, tal como hemocianina de lapa o toxoide del tétanos. Estos antígenos contienen epitopos de células B pero no epitopos de células T. El resto de proteína de dicho conjugado (la proteína "vehículo") proporciona epitopos de células T que estimulan a las células T auxiliares, que a su vez estimulan a las células B específicas de antígeno para que se diferencien en células plasmáticas y produzcan anticuerpos contra el antígeno. Las células T auxiliares también pueden estimular a otras células inmunológicas, tales como células T citotóxicas, y un vehículo puede desempeñar un papel análogo para generar inmunidad mediada por células, así como anticuerpos. Ciertos antígenos que carecen de epitopos de células T, tales como polímeros con un epitopo de células B repetido (por ejemplo, polisacáridos bacterianos), son

- intrínsecamente inmunogénicos hasta un grado limitado. Estos se conocen como antígenos T-independientes. Estos antígenos se benefician de la asociación con un vehículo, tal como el toxoide del tétanos, y en estas circunstancias provocan unas respuestas de anticuerpos mucho más fuertes. La conjugación del vehículo con polisacáridos bacterianos se emplea para producir una serie de "vacunas de conjugados" contra infecciones bacterianas, tales como *Haemophilus influenzae* (Hib) y meningococos del grupo C.
- En otra realización preferida de la invención, dicho antígeno es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a un tumor. Preferiblemente, dicho antígeno se selecciona del grupo de un antígeno de glangliósido, una hormona o un receptor de hormona, por ejemplo, el receptor de N-metil-D-aspartato o una parte de este.
- Una vía de administración preferida es la administración intradérmica, subcutánea, intramuscular o intranasal; sin embargo, el método de inmunización no está restringido a una vía de administración concreta.
- Un anticuerpo quimérico se produce por métodos recombinantes para que contenga la región variable de un anticuerpo con una región invariable o constante de un anticuerpo humano.
- Un anticuerpo humanizado se produce por métodos recombinantes para combinar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo con las regiones constantes (C) y las regiones de marco de las regiones variables (V) de un anticuerpo humano.
- Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos recombinantes en los que todas las regiones V de un anticuerpo de ratón o de rata se combinan con regiones C de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos híbridos recombinantes que fusionan las regiones determinantes de la complementariedad procedentes de una región V de anticuerpo de roedor, con las regiones de marco de las regiones V de un anticuerpo humano. También se emplean las regiones C del anticuerpo humano. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son las regiones dentro del dominio N-terminal de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, a las cuales se restringe la mayoría de la variación de la región V. Estas regiones forman bucles sobre la superficie de la molécula de anticuerpo. Estos bucles proporcionan la superficie de unión entre el anticuerpo y el antígeno.
- Los anticuerpos de animales no humanos provocan una respuesta inmunológica contra el anticuerpo extraño y su retirada de la circulación. Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen menos antigenicidad cuando se inyectan a un sujeto humano, porque tienen una cantidad reducida de anticuerpo de roedor (es decir, extraño) dentro del anticuerpo híbrido recombinante, mientras que las regiones de anticuerpos humanos no provocan una respuesta inmunológica. Esto produce una respuesta inmunológica más débil y una disminución en la eliminación del anticuerpo. Esto resulta claramente deseable cuando se emplean anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas. Los anticuerpos humanizados se diseñan para que tengan menos regiones de anticuerpos "extraños" y por tanto se cree que son menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos.
- También es posible crear regiones variables individuales, los denominados fragmentos de regiones variables de anticuerpos monocatenarios (scFv). Si existe un hibridoma para un anticuerpo monoclonal específico, está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica poder aislar scFv a partir de ARNm extraído de dicho hibridoma mediante RT PCR. Como alternativa, puede realizarse una selección de presentación de fagos para identificar los clones que expresan los scFv. Como alternativa, dichos fragmentos son "fragmentos de anticuerpos de dominio". Los anticuerpos de dominio son la parte de unión más pequeña de un anticuerpo (aproximadamente 13 kDa). Los ejemplos de esta tecnología se describen en los documentos US 6.248.516, US 6.291.158, US 6.127.197 y EP 0368684.
- Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para reticular un anticuerpo, en el que dicho anticuerpo es capaz de unirse a un polipéptido del receptor de CD40 y al menos un antígeno, que se caracteriza porque se proporcionan condiciones de reacción que seleccionan los conjugados con una valencia de anticuerpo baja.
- Según otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para preparar un conjugado según la invención, que comprende el fraccionamiento de una mezcla de reacción de conjugación.
- En un método preferido de la descripción, dicho fraccionamiento comprende las siguientes etapas:
- i) proporcionar una mezcla de reacción que consiste en un complejo conjugado de anticuerpo:antígeno reticulado heterogéneo;
 - ii) separar la mezcla de reacción en fracciones que contiene conjugados con un tamaño definido; y opcionalmente
 - iii) aislar los conjugados con una valencia de anticuerpo deseada.
- En un método preferido de la descripción, dicha fracción contiene un complejo conjugado con una valencia de anticuerpo de aproximadamente una media de cinco moléculas de anticuerpo por complejo.
- En otra realización preferida de la descripción, dicha fracción contiene un complejo de dos moléculas de anticuerpo,

preferiblemente dicho conjugado es un único anticuerpo unidad al menos a un antígeno.

En un método preferido de la descripción, dicho método se selecciona del grupo que consiste en un método de cromatografía de exclusión molecular, un método de cromatografía de afinidad, y un método de precipitación diferencial.

- 5 A continuación se proporciona una realización de la invención como ejemplo y haciendo referencia a las siguientes figuras:

la figura 1 ilustra el efecto de la valencia de un anticuerpo anti-CD40 sobre las respuestas inmunológicas primarias anti-rata; y

- 10 la figura 2 ilustra el efecto de la valencia creciente de un anticuerpo sobre las respuestas inmunológicas utilizando un anticuerpo anti-CD40.

Materiales y métodos

La valencia de anticuerpo de los conjugados puede variarse mediante un gran número de formas; en efecto, existe un gran número de formas posibles para realizar las conjugaciones que conocerán los expertos en la técnica. Las siguientes se incluyen solo como ejemplo.

- 15 *Alteración del grado de derivatización del antígeno*

Un medio para reticular antígenos con anticuerpos es maleimidar el antígeno, por ejemplo, utilizando sulfo-SMCC, y después hacer reaccionar el antígeno maleimidado con un anticuerpo tiolado (el anticuerpo puede tiolarse utilizando SATA o SPDP).

- 20 El grado de maleimidación del antígeno puede alterarse cambiando las concentraciones relativas de sulfo-SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfo-succinimidilo) y antígenos en la reacción.

- 25 Otro método para producir conjugados permite determinar una medición precisa del grado de derivatización del antígeno. Puede utilizarse el agente de reticulación SPDP (3-(2-piridiltio)propionato de succinimidilo) para tiolar el antígeno. El SPDP reacciona a pH 7-9 con un antígeno que contiene amina, produciendo un disulfuro mixto. Después, tras una reducción con ditiotreitól, se libera un cromóforo de 2-piridintiona, y un grupo sulfhidrilo permanece sobre la proteína. A partir de la cantidad de cromóforo liberado (según se determina mediante la absorbancia), es posible calcular la proporción media de derivatización del antígeno. Por supuesto, si esta proporción fuera, por ejemplo, 3 grupos sulfhidrilo por molécula de antígeno, los posteriores conjugados con anticuerpos maleimidados con sulfo-SMCC no podrían tener una valencia de anticuerpo mayor que 3. Así, el control del grado de derivatización y, por tanto, el número medio de restos tiol por molécula de antígeno puede limitar la valencia de anticuerpo de los conjugados.

- 30 Otro medio para controlar la valencia puede ser alterar el número de grupos reactivos presentes en el antígeno. Así, por ejemplo, puede utilizarse SDPD o SATA (entre otros agentes de reticulación) para añadir grupos sulfhidrilo al antígeno. Estos agentes de reticulación reaccionan ambos con aminas primarias, y por tanto la reacción puede ser con el resto amino-terminal, o con restos lisina presentes en otra parte de la proteína. Es posible retirar algunos de los restos lisina de un antígeno recombinante mediante mutagénesis específica dirigida a sitio. Por supuesto, es posible retirar los restos lisina de un péptido alterando la síntesis. Por supuesto, si se van a alterar las secuencias antigénicas, sería importante determinar que no se estén eliminando epitopos importantes mediante este procedimiento.

Alteración de las proporciones de antígeno:anticuerpo en la reacción de las proteínas derivatizadas

- 40 Las proporciones relativas del anticuerpo y antígeno derivatizado en la mezcla de reacción pueden alterarse, y esto tendrá efecto sobre el tipo de conjugado formado, que también dependerá del grado de derivatización y los tamaños relativos de los dos componentes.

Purificación de conjugados de diferente tamaño

- 45 Los conjugados producidos pueden purificarse mediante fraccionamiento de tamaño. Por ejemplo, los conjugados de glicoproteína D y anticuerpo de entre 200 kDa y 400 kDa pueden separarse de los conjugados más grandes mediante filtración en gel. Estos conjugados pueden contener no más de dos moléculas de anticuerpo por conjugado (de aproximadamente 150 kDa cada una).

- 50 Un método alternativo para la purificación de conjugados de menor peso molecular es el uso de la adición secuencial de polietilenglicol (PEG) a la mezcla de conjugado. Son necesarias unas concentraciones relativamente bajas de PEG para precipitar conjugados grandes, mientras que unas concentraciones crecientes precipitarán los conjugados de tamaño decreciente. Una alternativa al PEG sería una sal, tal como sulfato de amonio. De nuevo, unas concentraciones crecientes de sulfato de amonio conducirán a la precipitación de proteínas/conjugados gradualmente más pequeños. El PEG o el sulfato de amonio después pueden retirarse de los precipitados

redisueltos mediante diálisis.

5 Un método alternativo para seleccionar conjugados de baja valencia sería, en lugar dirigirse a conjugados de pequeño tamaño, extraer los conjugados de valencia alta mediante cromatografía de afinidad sobre Sepharose CL4B que porta el dominio extracelular del receptor IIb de Fc-gamma. Solo los conjugados de valencia alta se pegarán a la columna o, como alternativa, bajo condiciones isocráticas de NaCl 0,15 M, pH 7,4, tampón NaPO₄ 10 mM, las especies eluirán en orden de valencia, es decir, primero la valencia baja (no adsorbidas o débilmente adsorbidas en el "volumen vacío" de la columna o poco tiempo después).

10 Se puede evaluar el tamaño de los conjugados purificados mediante filtración en gel frente a patrones conocidos, o en algunas circunstancias, mediante electroforesis en gel de policarilamida. Después también debe determinarse la actividad de los conjugados, de forma más importante con respecto al mantenimiento de la unión del anticuerpo a CD40 o CD28, y el mantenimiento de la antigenicidad del antígeno que indica que los epitopos están intactos. Un método para verificar estas actividades bajas sería utilizar una tinción citométrica de flujo de células que expresan CD40 o CD28. Los conjugados se añaden a las células en PBS y se incuban durante 30 min sobre hielo. Las células después se lavan y se añade un anticuerpo (monoclonal o policlonal) contra el antígeno durante 30 min en hielo. El anticuerpo después se detecta utilizando un anticuerpo secundario marcado de modo fluorescente. Solo los conjugados con unión del anticuerpo (a CD40 o CD28) y con epitopos antigénicos intactos producirán una tinción positiva, y estarán listos para la evaluación de la inmunogenicidad.

Purificación/precipitación con PEG de fagos

20 Se sabe que PEG al 15% precipita la IgG libre del suero. Por tanto, una concentración menor sería apropiada para complejos, tal como la utilizada para precipitar complejos inmunológicos o moléculas más grandes, tales como viriones de fagos, como se explica a continuación.

1. Se añaden 30 ml de cepa de fago a un tubo SS-34 Oakridge.
2. Se añaden 7,5 ml de PEG-8000 al 20%/NaCl 2,5 M.
3. Se incuba en hielo durante 30 minutos o más.
- 25 4. Se centrifuga y sedimenta el fago a 11K durante 20 minutos.
5. Se vuelve a centrifugar 2-3x para eliminar toda la disolución de PEG (la utilización de una micropipeta facilita la retirada de toda la disolución).
6. Se resuspende el fago en STE (500-1000 ul).
7. Se traslada a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 14K durante 10 minutos.
- 30 8. Se traslada el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y se etiqueta.
9. Se titula el fago.

STE: para 100 ml, se añade 1 ml de Tris 1 M (pH 8), 0,2 ml de EDTA 0,5 M (pH 8), 2 ml de NaCl 5 M. Se somete a autoclave.

PEG: para 100 ml, se añaden 20 gm de PEG-8000 y 14,6 gm de NaCl, y se esteriliza con filtro.

35 **Ejemplo 1**

El anticuerpo anti-CD40 de ratón de rata (IgGa) induce una respuesta inmunológica muy potenciada en ratones contra IgG2a de rata, en comparación con IgG2a de rata control. Para evaluar los efectos de la valencia del anti-CD40 sobre el efecto adyuvante, se produjeron inmunógenos de diferentes valencias de anticuerpo CD40 como sigue:

- 40 a. Se empleó un anticuerpo anti-CD40 o un anticuerpo de control de isotipo solo como inmunógeno, con una valencia de un anticuerpo CD40 por "conjugado" (monomérico).
- b. Se reticularon anticuerpos anti-CD40 o de control de isotipo con un anticuerpo anti-Ig de rata, para producir una valencia de dos anticuerpos CD40 por conjugado (dimérico).
- 45 c. Se reticularon anticuerpos anti-CD40 o de control de isotipo con un anticuerpo anti-Ig de rata biotinilado, y avidina, para producir un conjugado multimérico (multimérico).

Para asegurarse de que cada ratón se inmuniza con la mezcla equivalente de antígenos, se añadieron proteínas control a los inmunógenos, de modo que los inmunógenos comprenden lo siguiente:

- a) 10 ug de mAb CD40 o de control de isotipo, 10 ug de IgG de ratón y 5 ug de avidina.
- b) 10 ug de mAb CD40 o de control de isotipo, 10 ug de anti-IgG de rata de ratón y 5 ug de avidina.
- 5 c) 10 ug de mAb CD40 o de control de isotipo, 10 ug de anti-IgG de rata de ratón biotinilado y 5 ug de avidina.

Se inmunizaron por vía intraperitoneal grupos de 5 ratones hembra BALB/c, y 10 días después se extrajo sangre y se ensayó el suero para detectar respuestas anti-IgG2a de rata mediante ELISA, tal como se describió previamente (Barr *et al.*, Immunology, 109:87-91, 2003). Brevemente, se revistieron placas ELISA de 96 pocillos durante la noche con IgG2a de rata (GL117) a 10 ug/ml en PBS a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con gelatina de pescado al 1% en PBS y se lavaron con PBS/Tween al 0,05%. Se realizaron diluciones en serie del suero, y después de una incubación durante 1 h a temperatura ambiente y un lavado, se añadió a los pocillos el conjugado (anti-inmunoglobulinas de ratón de cabra marcadas con peroxidasa de rábano, multiadsorbidas (Sigma)), y las placas se incubaron durante una hora más. Las placas se volvieron a lavar y se incubaron con sustrato (OPD, Sigma) durante 15 minutos y se leyeron a 490 nm. Las titulaciones se expresan como la recíproca de la dilución mayor del suero a la que el suero de ensayo produjo una DO mayor que el suero de ratón normal. Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2

La valencia creciente de los conjugados reduce la respuesta de anticuerpos. Se derivatizó la hemocianina de lapa (Sigma) con SPDP (Molecular Probes, utilizando los protocolos proporcionados por Molecular Probes), y los grupos sulfhidrilo se desprotegeron mediante una reducción con ditioneol, seguido de diálisis. El anticuerpo anti-CD40 o de control de isotipo se maleimizó utilizando sulfo-SMCC (Molecular Probes, utilizando los protocolos proporcionados por Molecular Probes), y las proteínas derivatizadas se mezclaron para formar conjugados como sigue:

- a) anticuerpo anti-CD40 al 100% (5 mg de anticuerpo por 1 mg de KLH);
- 25 b) anticuerpo anti-CD40 al 10%, anticuerpo de control de isotipo al 90% (5 mg de anticuerpo por 1 mg de KLH);
- c) anticuerpo anti-CD40 al 1%, anticuerpo de control de isotipo al 99% (5 mg de anticuerpo por 1 mg de KLH).

Este protocolo se diseñó para producir conjugados del mismo tamaño y contenido en antígeno, pero con diferentes valencias de anticuerpo CD40.

Se inmunizaron por vía intraperitoneal grupos de 3 ratones hembra BALB/c, y 10 días después se extrajo sangre y se ensayó el suero para detectar respuestas anti-KLH mediante ELISA, tal como se describió previamente (Barr *et al.*, Immunology, 109:87-91, 2003). Brevemente, se revistieron placas ELISA de 96 pocillos durante la noche con KLH a 10 ug/ml en PBS a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con gelatina de pescado al 1% en PBS y se lavaron con PBS/Tween al 0,05%. Se realizaron diluciones en serie del suero, y después de una incubación durante 1 h a temperatura ambiente y un lavado, se añadió a los pocillos el conjugado (anti-inmunoglobulinas de ratón de cabra marcadas con peroxidasa de rábano, multiadsorbidas (Sigma)), y las placas se incubaron durante una hora más. Las placas se volvieron a lavar y se incubaron con sustrato (OPD, Sigma) durante 15 minutos y se leyeron a 490 nm. Las titulaciones se expresan como la recíproca de la dilución mayor del suero a la que el suero de ensayo produjo una DO mayor que el suero de ratón normal.

Los resultados se muestran en la figura 2. Las respuestas de anticuerpos más fuertes contra KLH fueron producidas por los ratones inmunizados con los conjugados de CD40 al 1%. Puesto que se calculó que la derivatización de SPDP produce 200 sitios reactivos por molécula de KLH, la valencia de anticuerpo CD40 máxima calculada de los conjugados utilizados en el grupo C fue de 2 moléculas de anti-CD40 por molécula de KLH.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición de vacuna que comprende un conjugado aislado de un anticuerpo CD40 y al menos un antígeno específico de tumor o asociado a un tumor, en la que dicho conjugado consiste en un complejo en el que el anticuerpo CD40 y el antígeno tumoral se reticulan con un agente de reticulación y la valencia del anticuerpo del complejo consiste en una o dos moléculas de anticuerpo CD40.
- 2.- Una composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además un vehículo.
- 3.- Una composición según la reivindicación 2, en la que dicha composición comprende además un segundo adyuvante.
- 4.- Una composición según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno es un antígeno de gangliósido.
- 10 5.- Una composición según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno es una hormona o un receptor de hormona.
- 6.- Una composición según la reivindicación 5, en la que dicho antígeno es el receptor de N-metil-D-aspartato, o parte del mismo.

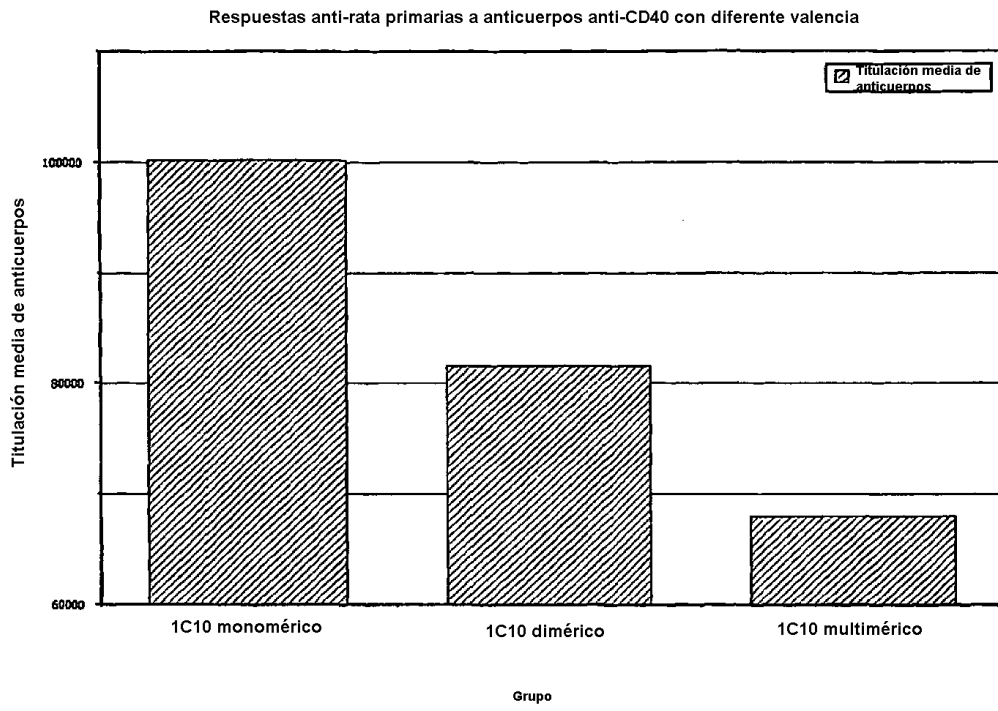


Figura 1

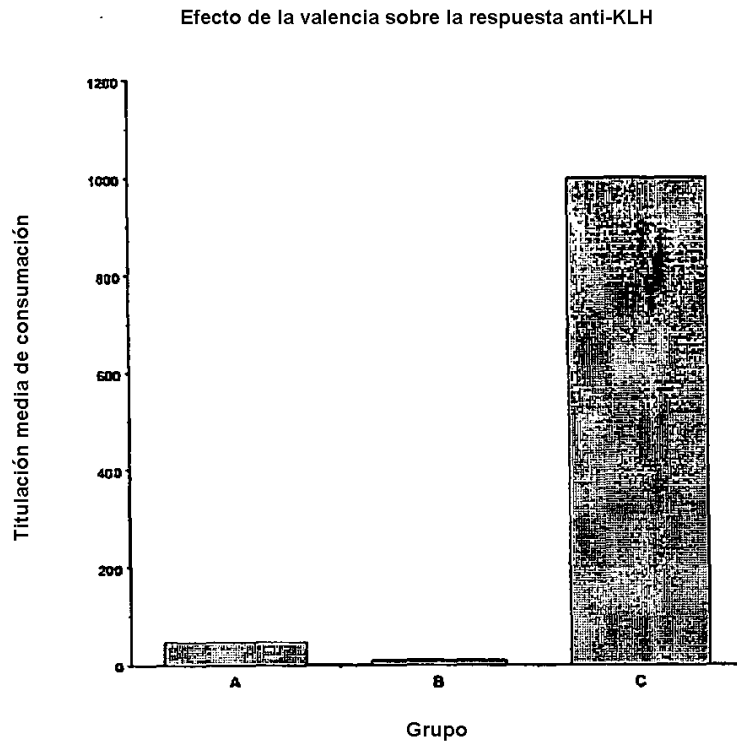


Figura 2